

JP07196401

Publication Title:

JP07196401

Abstract:

Abstract not available for JP07196401 Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-196401

(43) 公開日 平成7年(1995) 8月1日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 0 1 N 1/02

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平6-222

(22) 出願日 平成6年(1994) 1月6日

(31) 優先権主張番号 P 4 3 4 2 7 2 8 : 6

(32) 優先日 1993年12月15日

(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

特許法第30条第1項適用申請有り 1993年7月11日頒布
の「Cellular Biochemical and Molecular Aspects of Re
perfusion Injury 会議 要約書小冊
子」に発表

(71) 出願人 591009358

ドクトル カルル トーマエ ゲゼルシャ
フト ミット ベシュレンクテル ハフツ
ング

ドイツ連邦共和国 デー7950 ビベラッハ
アンデル リス (番地なし)

(72) 発明者 アドルフ グリュネルト

ドイツ連邦共和国 デー89070 ウルム
ロベルト コッホ シュトラーセ 8

(72) 発明者 ハウデ キウ

ドイツ連邦共和国 デー89070 ウルム
ロベルト コッホ シュトラーセ 8

(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外7名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移植器官の保存のための方法、装置及び灌流液

(57) 【要約】

【目的】 手術により除去された器官を、従来よりも長い期間にわたって、かつ／または適当な時間で従来よりも高温で保存する方法、その装置及び灌流液を提供することにある。

【構成】 手術により除去された肝臓の灌流及び保存用の水性の電解質を含む等張溶液であって、等張溶液が脂肪エマルジョン及び酸素キャリアーとしてのペルフルオロカーボンエマルジョンを含み、その溶液の脂肪含量が0.1～0.6 % (w/v) であり、かつペルフルオロカーボン含量が10～30 % (w/v) であることを特徴とする等張溶液。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 手術により除去された肝臓の灌流及び保存用の水性の電解質を含む等張溶液であって、等張溶液が脂肪エマルジョン及び酸素キャリアーとしてのペルフルオロカーボンエマルジョンを含み、その溶液の脂肪含量が0.1～0.6% (w/v) であり、かつペルフルオロカーボン含量が10～30% (w/v) であることを特徴とする等張溶液。

【請求項2】 溶液が3.5～100 ミリモル/lのカリウムイオン、0.8～5 ミリモル/lのマグネシウムイオン、及び15～146 ミリモル/lのナトリウムイオンを含むことを特徴とする請求項1に記載の溶液。

【請求項3】 溶液の重量オスモル濃度が350～400 ミリオスモル/kg であることを特徴とする請求項1に記載の溶液。

【請求項4】 脂肪エマルジョンの脂肪粒子が卵レシチンで乳化された大豆油からなることを特徴とする請求項1に記載の溶液。

【請求項5】 脂肪エマルジョンの脂肪粒子が200～200nmの平均粒径を有することを特徴とする請求項1に記載の溶液。

【請求項6】 生存可能な状態の手術により除去された肝臓の灌流及び保存用の請求項1～5の少なくとも一つに記載の溶液を調製するための水性脂肪エマルジョンの使用。

【請求項7】 手術により除去された肝臓の体外保存方法であって、その肝臓を請求項1～5の少なくとも一つに記載の溶液中に貯蔵し、この溶液で灌流することを特徴とする体外保存方法。

【請求項8】 保存が15～30℃の温度で行われることを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】 保存が48時間まで続くことを特徴とする請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】 酸素を保存中に灌流液中に導入することを特徴とする請求項7～9の少なくとも一つに記載の方法。

【請求項11】 移植のために除去された器官の保存用の装置であって、装置が灌流液用の容器（その中に、器官が灌流液により囲まれて含まれ得る）からなり、その容器が容器と器官の血管の間に灌流液を循環させるのに適した供給管及びポンプを備えており、かつ装置中に含まれた灌流液の酸素濃度を維持するための装置を備えていることを特徴とする保存用の装置。

【請求項12】 灌流液の循環用の供給管及びポンプが容器の外部に配置されていることを特徴とする請求項11に記載の装置。

【請求項13】 装置が器官を保持または懸垂するための装置を含み、器官の全表面が灌流液と接触していることを特徴とする請求項11または12の一項に記載の装置。

【請求項14】 装置が灌流液ひいては灌流器官の温度

を調節し得る装置を備えていることを特徴とする請求項11～13の少なくとも一つの項に記載の装置。

【請求項15】 水性の電解質を含む溶液中で灌流される移植のために除去された肝臓の生存度の試験方法であって、少なくとも一種のアミノ酸を灌流液に添加し、そして或る時間の後に、灌流液中のアミノ酸または尿素の濃度を測定することを特徴とする試験方法。

【請求項16】 アミノ酸の混合物を添加することを特徴とする請求項15に記載の方法。

【請求項17】 10～100 ml、好ましくは40～60mlの10～20%のアミノ酸溶液を使用することを特徴とする請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】 水性の電解質を含む溶液中で灌流される移植のために除去された肝臓の生存度の試験方法であって、脂肪エマルジョンをその溶液に添加し、そして或る時間間隔の後に、遊離脂肪酸の濃度を測定することを特徴とする試験方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、移植のために除去された器官、特にヒトの肝臓の保存に関するものであり、更に詳しくは、これらの器官の保存のための方法、装置及び灌流液に関する。

【0002】

【従来の技術】 最初のヒトの肝臓移植は1963年にトーマス・スタージル(Thomas Starzl)博士により行われた(スタージルら著、Surg. Gynecol. Obstet 17: 659-676 (1963))。その後、技術上及び医療上の治療の増大された可能性が、肝臓移植医療の世界中の分野を急激な増大及び範囲の点で発展させた。制限因子は、未だかなり不足している移植可能な生体器官の利用可能性であった。肝臓移植の成功に最も重要な前提条件の一つは、全ての移植でそうであるように、供与肝臓の損傷のない体外保存である。1989年まで、供与肝臓は、除去と移植の間の期間に、高い重量オスモル濃度及び高いカリウム濃度を有する溶液中に保存された。典型的な組成物は後述されるユーローコリンズ(Euro-Collins)溶液であった(スタージルら著、Current Problems in Surgery, Liver Transplantation: A 31-Year Perspective, Part 1, Year Book Medical Publishers, Inc., 1990, 69頁を参照のこと)。重炭酸塩10ミリモル/l; 塩化物15ミリモル/l; リン酸塩57.5モル/l; ナトリウム10ミリモル/l; カリウム115 ミリモル/l; グルコース194g/l; 重量オスモル濃度375 ミリオスモル/l及びpH7.4。この溶液を使用する場合、肝臓は、除去された後に、冷却下、例えば、4℃に保たれる必要がある。安全な貯蔵のための時間の制限は約8時間である。

【0003】 この保存の系では、二つの問題がある。第一に、低体温が細胞の膨潤を生じ、その結果、洞様血管細胞内層が露出される。第二に、わずかに8時間の貯蔵

時間が非常に短い。ベルザー(Belzer)(ウィスコンシン大学)により開発された通常の灌流液は、或る場合に24時間までの貯蔵時間を可能にする改良溶液である。ウィスコンシン大学で開発された溶液は、下記の組成を有する(スタージルら著、Current Problems in Surgery, Liver Transplantation: A 31-Year Perspective, Part 1, Year Book Medical Publishers, Inc., 1990, 69頁を参照のこと)。リン酸塩25ミリモル/l; ラクトビオネート100 ミリモル/l; ナトリウム30ミリモル/l; カリウム120 ミリモル/l; マグネシウム5ミリモル/l; ヒドロキシエチル澱粉50g/l; ラフィノース17.8g/l; アデノシン1.34g/l; グルタチオン0.922g/l; インシュリン100 単位; アロプリノール0.136g/l; スルファメトキサゾール40mg/l; トリメトプリム8mg/l; デキサメタゾン8mg/l; 並びに320 ミリオスモル/lの重量オスモル濃度及び7.4のpH。

【0004】特別な臨床上の応用の実験研究において、単離された肝臓はこの溶液を使用して48時間まで0℃～4℃でうまく低温貯蔵され、その後、うまく同所移植されていたが、それにもかかわらず、この系の系統的な使用は、所謂“低温損傷”(これは一次の移植後の肝臓不全の原因であることが明らかである)の次第に増加する報告をもたらした。この損傷を避けるために、幾つかの研究プロジェクトでは単離された肝臓を7℃、15℃及び37℃の更に高い温度で保存しようとする試みがなされていた。しかしながら、これらの試みは、従来、認められている研究グループによる検討または文献のいずれにおいても、実用的な操作の報告された開発を生じていなかった(スタージルら著、Current Problems in Surgery, Liver Transplantation: A 31-Year Perspective, Part 1, Year Book Medical Publishers, Inc., 1990, 49～116頁)。低温保存中に起こる上記の損傷及び制限された貯蔵時間が、利用可能な生体器官の不足をもたらす。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、以前よりも長い期間にわたって、かつ/または適当な時間にわたって更に高温、例えば、周囲温度で供与器官を貯蔵することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、手術により除去された肝臓(供与肝臓)を生存可能な状態で保存するための水性の電解質を含む灌流液を調製するための水性脂肪エマルジョンの使用に関する。灌流液は更に酸素キャリアーとしてペルフルオロカーボンエマルジョン(PFCエマルジョン)を含む。実際に、供与肝臓が本発明により保存される場合、生存度がPFCエマルジョンからの酸素の適度の供給及び脂肪エマルジョン(これは、十分に酸素化されている場合には、肝臓に生理基質を与える)の提供により維持される。都合よくは、除去された器官の灌流中に、酸素が適当な管及びフィルターを通し

て灌流液中に気泡の形態で導入される。酸素流量は、例えば、0.1～1リットル/分、好ましくは0.3～0.7リットル/分である。0.5リットル/分の流量が特に好ましい。

【0007】使用される脂肪エマルジョンは市販の成分を含んでいてもよい。それらは臨床上的の注入療法から採取されることが好ましい。水性の電解質を含む等張溶液中に卵レシチンで乳化された大豆油をベースとする安定な脂肪エマルジョン、例えば、アボリピッド(Abolipid, 商標)10%～20%(アボット(Abbott))、イントラリピッド(Intralipid, 商標)10%/イントラリピッド20%(フリマー・カビ(Frimmer Kabi))、リポフンジン(Lipofundin, 商標)MCT10%～20%(ブラウン・メルスンゲン(Braun Melsungen))、リポフンジン(商標)S10%～20%(ブラウン・メルスンゲン)、リポハーム(Lipoharm, 商標)10%、20%(シバ/ホルモンケミ(Schiba/Hormonchemie))、リポベノエス(Lipovenoes, 商標)10%、20%(フレセニウス(Fresenius))が使用される(ロート・リスト(Rote Liste)、BPI e.V., 1992を参照のこと)。また、脂肪エマルジョンは、例えば、Clinical Nutrition 11, 223-236 (1992)に記載されているような既知の方法により調製されてもよい。脂肪エマルジョンの脂肪粒子は、例えば、200～2000nm、好ましくは600～1000nmの平均粒径を有していてもよい。

【0008】更に、本発明は、移植のために除去された器官、特に手術により除去された肝臓の灌流及び保存用の水性の電解質を含む等張溶液であって、等張溶液が脂肪エマルジョン及び酸素キャリアーとしてのペルフルオロカーボンエマルジョンを含むことを特徴とする等張溶液に関する。その灌流液は、0.1～0.6%(w/v)の脂肪含量を有する灌流液を得るように、灌流液1リットル当たり0.5～3%(v)の20%(w/v)の脂肪エマルジョンまたは異なる濃度を有する等量の脂肪エマルジョンを含むことが好ましい。灌流液の脂肪含量は0.2～0.5%(w/v)であることが好ましい。0.4%(w/v)の脂肪含量が特に好ましい。灌流液のペルフルオロカーボン含量は10～30%(w/v)、好ましくは20%(w/v)である。明記された%は容量(v)または重量/容量(w/v)を表す。文献には、幾つかのペルフルオロカーボン物質が酸素キャリアーとして記載されており、これらが本発明に使用し得る。例えば、欧州特許出願第282948号、同第231070号、同第91820号、同第190393号、同第220152号及びフランス特許第850992号明細書を参照のこと。

【0009】ペルフルオロオクチルブロミド(PFOB)またはペルフルオロデカリン(PFD)とペルフルオロトリプロピルアミン(PFT)の混合物が好ましい。フルオゾル(Fluosol)DAとして知られているPFDとPFTの混合物の市販製剤がグリーン・クロス・コーポレーション社(Green Cross Corporation)により製造される。上記のように、ペルフルオロカーボンエマルジョンが既に知られてお

溶液中で起こるからである。上記の灌流実験において、遊離脂肪酸の増加がなく、それ故、脂肪酸が肝臓により利用されていることが明らかであった。こうして、本発明は、水性の電解質を含む溶液中で灌流される移植のために除去された器官、特に肝臓の生存度の試験方法であって、脂肪エマルジョンをその溶液に添加し、そして或る時間の後に、遊離脂肪酸の濃度を測定することを特徴とする試験方法を提供する。

【0014】

【実施例】

実施例1

下記の3種の溶液を研究した。

A. 下記の組成を有するプレットシュナイダー(HTK) 溶液

注射用の水中、塩化ナトリウム15ミリモル/l; 塩化カリウム9ミリモル/l; 2-オキソグルタル酸水素カリウム1ミリモル/l; 塩化マグネシウム $\times 6H_2O$ 4ミリモル/l; ヒスチジン $\times HCl \times H_2O$ 18ミリモル/l; ヒスチジン180ミリモル/l; トリプトファン2ミリモル/l; マンニトール30ミリモル/l;

重量オスモル濃度: 310 ミリオスモル/kg;

アニオン: Cl 50mval;

H=ヒスチジン、T=トリプトファン、K=カリウム。

B. ペルフルオロカーボン(PFC) エマルジョンと一緒の(A)のプレットシュナイダー溶液

C. 脂肪エマルジョンと一緒の(B)のプレットシュナイダー溶液及びPFC エマルジョン

【0015】溶液B及びCの調製

激しい攪拌下で、新しいプレットシュナイダー電解質溶液8リットルを乳化剤(セルバ(Serva)、ハイデルベルグ)396gと数回に分けて合わせる。乳化剤が完全に溶解して直ぐに、その溶液を電解質溶液と共に8.1リットルまでトッピングし、5℃に冷却する。高圧ホモジナイザー(APV ガウリン(Gaulin)により製造されたLab60)を純粋な電解質溶液約600mlですすぐ。次いで電解質溶液の一部をホモジナイザーの貯蔵容器に注入する。次いでその混合物を500バールの圧力のCO₂のもとに均一にし、その間、電解質乳化剤溶液の残り及びペルフルオロカーボン1000mlを、ペルフルオロカーボンの添加が完了した直後に最初の均一化実験が終了するように十分に徐々に分離ロートにより貯蔵容器に夫々添加する。次いでエマルジョンを氷水で5℃に冷却し、500バールの圧力のCO₂のもとにもう一度均一にする。この操作を5回繰り返す。仕上エマルジョンはペルフルオロカーボン20%w/vを含み、180~240nmの平均粒径を有する。それは使用前の短期間にわたって約5℃で貯蔵可能である。溶液Cは、仕上灌流液C中に例えば0.2%(w/v)の脂肪含量を得るように、溶液Bから20%(w/v)の脂肪エマルジョン、例えば、イントラリピッド-20を混合することにより得られる。従って、溶液C1リットルは、例えば、20

mlの20%(w/v)の脂肪エマルジョンを含む。

【0016】実施例2

数匹の体重20kgの家畜のブタを静脈内麻酔し、開腹し、開胸し、体重1kg当たり125単位のヘパリンを静脈内投与してそれらの肝臓を通常の手術方法により除去する。下部の門脈及び大静脈を切開し、カニューレを挿入する。肝臓に残っている残留血液を、カニューレ挿入した門脈中の溶液A、BまたはC(実施例1)300mlの注入によりフラッシュする。このフラッシュ中に、総胆管にカニューレを挿入する。カニューレ挿入した肝臓11を、それが容器1(図1を参照のこと)中に含まれた灌流液中に完全に浸漬されるまでその容器に入れる。0.1%(w/v)の初期脂肪含量を有する実施例1により調製された溶液Cを灌流液として使用する。灌流回路2は門脈13及び大静脈12を外部供給管を介して外部容器に連結し、灌流液がポンプ3、例えば、ぜん動ポンプにより肝臓と容器の間で連続的に循環される。酸素気泡が酸素ガスびん4から管5を介して容器1の内端部のフィルター(図1に示されていない)を通して約0.5リットル/分の流量で灌流液にパイプ輸送される。容器中に、肝臓を適所に固定すると共に、肝臓表面のかかなりの部分が灌流液との接触を失わないことを確保するためのプラスチックまたは金属のネット6がある。肝臓もしくは装置または灌流液のいずれもが温められ、また冷却される必要はない。

【0017】総胆管のカニューレ挿入7により、流出する胆汁が外部容器中に回収される。連続灌流が器官の除去の10分後に門脈を介して始まる。灌流液のメジアン流量が0.3ml/肝臓の重量1g/分に調節される。肝臓が全体外保存期間にわたって適当に緩衝された溶液中で約22℃の周囲温度に保たれる。参照番号8は分析目的のための灌流液の試料の除去位置を表す。例えば、供給管中に組み込まれた弁と対にされた注射シリンジからなる脂肪エマルジョン用のインプット位置10と圧力ゲージ9が供給管2中に組み込まれている。脂肪エマルジョンの消費を補うために、夫々6時間の期間後に、12.5mlのイントラリピッド-20が灌流液に直接供給される。4時間の間隔で、バイオプシーが電子顕微鏡による試験のために採取され、灌流液の組成(電解質、pH、容量オスモル濃度及びガス分析)を分析するために灌流液の試料が採取される。肝臓の機能につきチェックするために、灌流液が2時間間隔でサンプリングされる。

【0018】尿素合成

尿素生産試験を、50mlの15%のアミノ酸溶液(Dr. カール・トマエGmbHのトマエアミンN15)を4時間毎に灌流液に添加し、尿素及びアンモニアの測定用の試料を2時間の間隔で採取することにより行う。文献により知られている方法を使用して尿素及びアンモニアを測定する。尿素測定が、例えば、スパイド(R. Spayd)ら著、Clin. Chem. 24, 1343-1344.(1978)に記載されており、一方、アンモニアレベルがブルース(W. A. Bruce)らにより記載さ

れたようにして測定される (Clin.Chem. 24, 782-787 (1978))。図2は、溶液A、B及びC (実施例1を参照のこと) の比較により、ブタの肝臓からの灌流液中の尿素の濃度の増加を示し、この場合、灌流を下記の変更に
より上記のようにして行った。

- a) 酸素供給を伴わない灌流液A
- b) 酸素供給を伴う灌流液A
- c) 酸素供給を伴う灌流液B
- d) 酸素供給を伴う灌流液C

【0019】図3は、図2と同様に、同灌流液中のアンモニア濃度の発生を示す。図2(d)は、本発明の灌流液Cが酸素流入と共に使用される場合に、尿素の濃度が48時間の期間にわたって一定に増加し、しかも灌流が比較溶液A及びBで行われる場合 (図2(a)~(c)) を参照のこと) よりもかなり大きい程度に増加することを明らかに示す。図3(d)は、溶液A及びB (図3(a)~(c)) とは対照的に、灌流液C中のアンモニア濃度がこの灌流期間中にごく小さいままであることを示す。これは、本発明の灌流液Cを使用する試験器官の機能の優れた維持を明らかに実証する。電子顕微鏡のスライドを組織試料から作成し、これらのスライドをコンピューターシステムを使用してプラニメトリーにかけ、こうしてミトコンドリアの数並びにミトコンドリアの直径及び形状に関する定量的

な数値を得ることを可能にする。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の器官を保存するための装置の略図である。

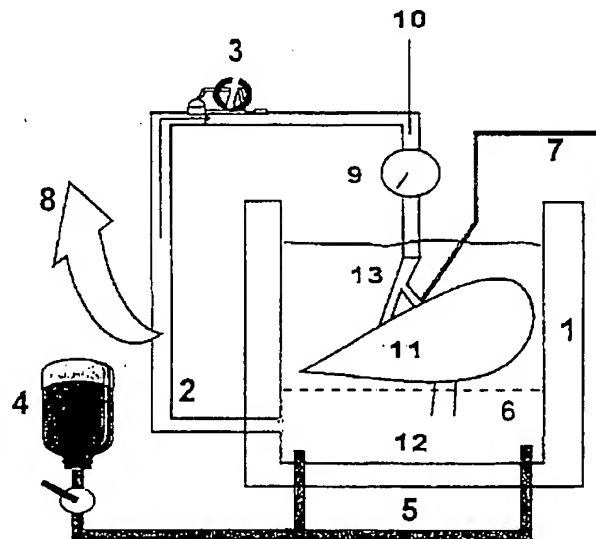
【図2】ブタの肝臓からの灌流液中の尿素の濃度を示すグラフ図である。

【図3】ブタの肝臓からの灌流液中のアンモニアの濃度を示すグラフ図である。

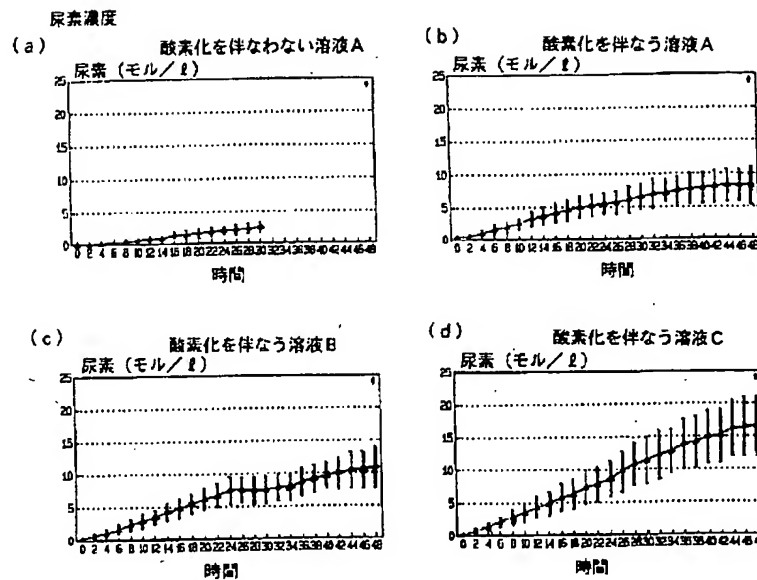
【符号の説明】

- 1-容器
- 2-灌流回路
- 3-ポンプ
- 4-酸素ガスびん
- 5-管
- 6-ネット
- 7-カニユーレ挿入
- 8-灌流試料の除去位置
- 9-圧力ゲージ
- 10-インプット位置
- 11-肝臓
- 12-大静脈
- 13-門脈

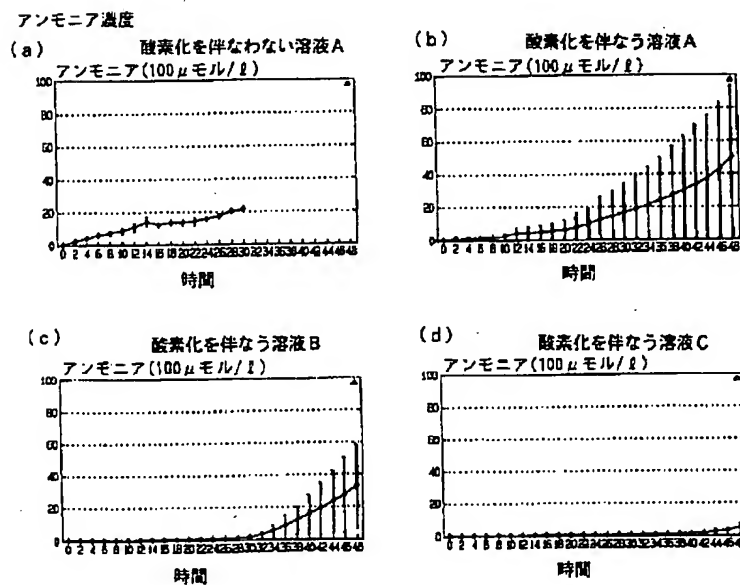
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 イレーネ ミュラー
ドイツ連邦共和国 デー89075 ウルム
オーベレール ハーゼンコップフヴェーク

44

(72)発明者 シュテファン シュー
ドイツ連邦共和国 デー89075 ウルム
オーベレール ハーゼンコップフヴェーク

44

(72)発明者 ゲラルト シュタインバッハ
ドイツ連邦共和国 デー89070 ウルム
シュタインハーヴェルシュトラッセ 9

(72)発明者 ローマン ヴェンナウエル
ドイツ連邦共和国 デー89070 ウルム
ロベルト コッホ シュトラーセ 8

(72)発明者 クリスチャン フリードリッヒ ヴォルフ
ドイツ連邦共和国 デー89070 ウルム
ロベルト コッホ シュトラーセ 8